

INGEKOMEN 24 MAART 2011

RIVM/SEC/Bureau GGO
t.a.v. de heer Bleijs
Postbus 1
3720 BA BILTHOVEN

Boxmeer, 17 maart 2011

Betreft : IM10-004 .vr2 aanvullende info

Geachte heer Bleijs,

In antwoord op uw verzoek om aanvullende informatie dd 07 december 2010, het volgende:

- In aanvulling op uw antwoord in het aanvraagformulier in sectie A.34, geeft u aan dat de werkzaamheden alleen op de Intervet locatie plaats zullen vinden. In de vergunning moet de locatie waar de proeven plaatsvinden vermeld worden. In verband met de inspraakprocedure en de uit te voeren milieurisicobeoordeling, dient u de adresgegevens van deze locatie bij de vergunningaanvraag aan te leveren.

Het betreft de locatie van Intervet in de gemeente Sint Anthonis.

- In sectie B3.5 van het aanvraagformulier geeft u aan dat de bacteriën 'limited survival' in het milieu hebben omdat deze geen sporen produceren. U dient dit nader toe te lichten aangezien u in de aanvullende informatie hier niet op in gaat. De eigenschap om geen sporen te vormen komt voor bij een groot aantal in het milieu voorkomende bacteriën, en is op zich onvoldoende onderbouwing van gelimiteerde overleving in het milieu. Is de 'limited' survival uitsluitend gebaseerd op bovenstaande eigenschap of bezitten de te gebruiken stammen nog andere eigenschappen die bijdragen aan de limited survival? Zo ja, dan dient u ook deze eigenschappen te beschrijven. U dient te onderbouwen hoe de eigenschap om geen sporen meer te kunnen vormen en eventuele overige eigenschappen leiden tot gelimiteerde overleving in het milieu en u dient hierover nadere literatuur- en/of experimentele gegevens aan te leveren.

Pasteurella multocida en Mannheimia haemolytica zijn beiden obligate parasieten die buiten de gastheer niet goed kunnen overleven. Ze vormen geen sporen en van beide bacteriën zijn ook geen andere overlevingsstructuren beschreven. Eveneens zijn er geen andere niches buiten de gastheer bekend. Op basis van de mutatie (deletie) van beide vaccinstammen is er geen enkele reden om te verwachten dat deze stammen beter zouden overleven dan wildtype. Omdat de bacteriën bepaalde eigenschappen missen t.o.v. wildtype zou het waarschijnlijker zijn dat ze juist niet beter overleven buiten de gastheer.

Spiking studies met Pasteurella multocida Δ hyaE toonden aan dat deze mutant niet langer dan 40 dagen in de grond en niet langer dan 50 dagen in vijverwater kan overleven bij een temperatuur van 2-25°C (zie bijlage 38). Spiking studies met Mannheimia haemolytica Lkt-toonden aan dat deze mutant gedurende 28 dagen incubatie in aarde of [redacted] toenam en/of niet overleefde bij temperaturen tussen de 2 en 25°C (zie bijlage 39). Uit bovengenoemde gegevens kan geconcludeerd worden dat buiten de gastheer uitdoving zal plaatsvinden.

- In het aanvraagformulier in sectie B3.13 gaat u in op de [redacted] verspreiding en overlevingskansen van het GGO in de gastheer. In de aanvullende informatie gaat u in op literatuurgegevens of onderzoeksdata waarin kort omschreven wordt in hoeverre het GGO minder

goed kan overleven dan het wildtype micro-organisme in de gastheren. U dient voor de milieurisicoanalyse een gedetailleerde beschrijving van de opzet van de in de bijlage beschreven experimenten en hun uitkomsten te overleggen. Tevens dienen de te verwachten effecten van het ggo op andere potentiële niet-doelwit organismen, zoals knaagdieren, vogels, mensen etc. uitgebreid beschreven en goed onderbouwd te worden. Indien relevante verspreidingsgegevens en gegevens over de reservoirs van de wildtype bacteriën in het milieu beschikbaar zijn dient u deze in uw onderbouwing op te nemen en mee te sturen.

Als bijlage vindt u de volledige rapporten waarvan de summary als bijlage 38, 39, 1, 6, 7, 8, 9, 10 al was aangeleverd, waarin gedetailleerde beschrijving van de experimenten en resultaten.

- In de aanvullende informatie geeft u aan dat de kadavers zullen worden aangeboden voor destructie. Daarbij wordt onvoldoende duidelijk hoe wordt voldaan aan de wettelijke verplichtingen ten aanzien van de verwerking van materiaal dat niet is bestemd voor menselijke of dierlijke consumptie. U dient dit nader toe te lichten.
De kadavers zullen worden aangeboden aan een destructiebedrijf als categorie 1 materiaal. Destructiebedrijven dragen zorg voor een correcte verwerking van categorie 1 ('uitsluitend geschikt voor vernietiging') en categorie 2 ('niet voor dierlijke consumptie') materiaal (volgens verordening EU/1774/2002).
- U geeft in de aanvullende informatie op onvoldoende wijze aan dat de dieren worden gehouden volgens gangbare routines voor het houden van runderen op een conventionele boerderij. Wat zijn "gangbare routines" en "farm routines" en wat is de werkwijze als een overleden dier of afval dat in potentie GGO bevat wordt afgevoerd? U dient dit nader te beschrijven door bijvoorbeeld het toevoegen van SOPs of vergelijkbare documenten.
*Afhankelijk van de leeftijd zullen de dieren individueel binnen in boxen of als groep op stro worden gehuisvest. Afhankelijk van leeftijd, soort kalf, conditie en gewicht zal er gevoerd worden met melk en/of brokken en/of hooi. De stal wordt indien nodig schoongemaakt en bedding zal worden opgeslagen totdat het wordt afgevoerd naar derden (om bv te worden uitgereden). Bij sterfte en aan het einde van de proef zullen de dieren te allen tijde als proefdier (categorie 1) worden aangeboden aan het destructiebedrijf (zie vorige vraag).
Aanvullende maatregelen om vrijkomen in het milieu te voorkomen zijn niet nodig, omdat vrijkomen in het milieu (zie risicoanalyse) niet tot problemen zal leiden.*
- In de aanvullende informatie zijn hardcopies van de literatuurverwijzingen bijgevoegd. Echter, niet alle referenties zijn bijgevoegd. Ik verzoek u om het artikel van Rhoades and Rimler (1993) aan te leveren.
Het betreffende artikel is bijgevoegd (bijlage 41)

Voor de volledigheid voegen wij de milieurisicoanalyse als bijlage bij, zoals in het gewijzigde aanvraagformulier per december 2010 (onderdeel F) is opgenomen.

Met vriendelijke groet,



Intervet / Schering Plough Animal Health

Aantal bijlagen: 11

Cc. [redacted] (Directie), [redacted] (VM-I), [redacted] (VM-II)

Bijlage bij IM10-004.vr2

Milieurisicoanalyse

Pasteurella multocida

Pasteurella multocida can be found as a commensal organism in the respiratory and digestive tracts of a wide range of domestic and wild animals worldwide. *P. multocida* serotype A is a common secondary pathogen in respiratory disease in ruminants. The lungs of animals subjected to environmental stress as well as concurrent or prior infection by viruses or *M. haemolytica*, can be colonized by *P. multocida*. Once established in the lung, *P. multocida* can cause chronic or severe and often fatal pneumonia.

P. multocida serotype A has been associated with atrophic rhinitis, fowl cholera and respiratory disease in ruminants.

Although *P. multocida* has a wider species range, strains do tend to be species specific, i.e. most *P. multocida* isolates appear to be specialized for virulence in the host of isolation. The parental *Pasteurella multocida* strain 1062 is capable of replication in the bovine lung, and is virulent in cattle. It is avirulent in turkeys.

Assessment of human isolates of *P. multocida* indicate that the majority of human infections are related to infection from cat and dog related injuries, i.e. scratch and bite wounds (Weber *et al.*, 1984). Since the parental organism was a field isolate originally cultured from pneumonic bovine lung tissue it is unlikely that it could readily spread to and cause disease in humans, but could potentially spread to other ruminants.

Mannheimia haemolytica

The host range of *Mannheimia haemolytica* A1 is strictly limited to ruminants.

Although *M. haemolytica* is commonly found in the upper respiratory tract (URT) of healthy cattle, exposure of cattle to stress leads to an explosive proliferation and colonization of *M. haemolytica* A1 in all areas of the URT. This heavily colonized URT then becomes the source for lung exposure via aspiration of nasopharyngeal secretions which ultimately leads to the fibrinonecrotic pleuropneumonia commonly associated with *M. haemolytica*.

Both *Mannheimia* and *Pasteurella* are highly host adapted and host dependent; they do not form spores and also have no other traits to survive outside the host. Therefore they have only limited survival in the environment. In cattle these bacteria are passed generally nose to nose through the respiratory tract.

Both bacteria are present in low numbers in the upper respiratory tract of practically all (healthy) cattle. Only after periods of stress (i.e. viral infection, transport, sudden weather changes etc) these commensal opportunists start proliferating and cause clinical disease.

GMOs

PM-MH is a live vaccine for administration to cattle, containing modified (attenuated) versions of the two primary bacterial agents responsible for bovine pneumonic pasteurellosis, *Pasteurella multocida* strain (\DeltahyaE) and *Mannheimia haemolytica* strain (Lkt-).

Both bacteria are deletion mutants i.e. genetic material has been deleted resulting in attenuation. No additional genetic material which could be transferred has been incorporated in the bacteria.

The *Pasteurella multocida* strain (\DeltahyaE) has been made acapsular by deleting a portion of the *hyaE* gene, the first gene in the capsule biosynthetic operon. This deletion attenuates the wild-type virulence of the organism.

The *Mannheimia haemolytica* strain (Lkt-) has been attenuated by deleting a portion of the leukotoxin A gene, resulting in an ineffective leukotoxin that remains capable of eliciting a protective immune response.

Leukotoxin (Lkt) of *M. haemolytica* is one of the most important factors contributing to lung injury.

The deletion mutants are unable to induce physiological effects. The deleted genes encode for virulence determinants which now are lacking. As a consequence the vaccine strains are attenuated and much less virulent and less capable to survive in the host.

F1. Geef aan volgens welk scenario het GMO en/of een afgeleide van het nucleïne zuur preparaat zich vanuit het proefdier kan verspreiden in het milieu.

Het vaccin is bedoeld voor subcutane en ook intranasale toediening aan jonge kalveren. Na subcutane toediening is de kans zeer klein dat de vaccinstammen in het milieu terecht komen. De bacteriën blijven slechts tijdelijk op de injectie plaats aanwezig en worden vervolgens opgeruimd door het lichaam.

Studies hebben aangetoond dat de deletiestammen niet worden uitgescheiden door kalveren na vaccinatie met een 10x hogere dosis dan normaal en dat spreiding naar andere gevoelige kalveren niet plaatsvindt. De bacteriën konden niet worden geïsoleerd uit neusswabs en er was geen sero-conversie in de contact controle kalveren. Het GGO zal niet in het milieu komen via subcutaan gevaccineerde dieren.

Vaccinstammen kunnen vrijkomen na intranasale vaccinatie. Het is bekend dat kalveren na intranasale toediening de vaccin stammen tijdelijk in geringe hoeveelheden uit kunnen scheiden. Via neuscontact zouden andere kalveren in contact kunnen komen met de vaccinstammen. De strooisellaag zou na hoesten, niesen of speekselen besmet kunnen raken. Buiten de gastheer kunnen de vaccinstammen echter niet lang overleven.

Het risico van deze uitscheiding is echter zeer beperkt, omdat uitgebreid aangetoond is dat de stammen geattenuëerd en veilig zijn voor dieren. Omdat we te maken hebben met schone deletiemutanten is het aanwezig zijn in het milieu geen bezwaar, er is geen genetisch materiaal toegevoegd, dat eventueel zou kunnen worden overgedragen. Daarnaast kunnen deze stammen niet overleven buiten de gastheer.

F2. Geef aan welke mogelijk nadelige effecten gepaard kunnen gaan met blootstelling van mens of milieu aan het GGO

Beide stammen zijn niet pathogeen in relevante niet-doelwit diersoorten. De vaccinstammen zijn niet in staat om fysiologische effecten te induceren. De gedeleteerde genen coderen voor virulentie factoren die nu missen. Als gevolg daarvan is de vaccinstam geattenuëerd en veel minder virulent en minder in staat te overleven in de gastheer. Het vaccin (subcutane route) is getest in kalveren voor werkzaamheid en veiligheid d.m.v. overdosis vaccinatie, uitscheiding en spreiding studies en voor stabiliteit na passage door de dieren. Het vaccin is ook getest in uitgebreide veldstudies op verschillende locatie in the USA, en hier zijn geen nadelige effecten gerapporteerd.

Alle kalveren zijn normaal gesproken drager van wildtype *Pasteurella multocida* en *Mannheimia haemolytica*. Met name na intranasale toediening zal er contact zijn tussen vaccinstam en wildtype stammen.

Aan een eventuele recombinatie tussen het GGO en wildtype zijn geen gevolgen voor het milieu verbonden. Als een wildtype bacterie de deletie zou overnemen, wordt de mutant dan wildtype en de wildtype een mutant, met inperkende eigenschappen als hierboven beschreven. We hebben te maken met schone deletiemutanten, d.w.z. er is geen genetisch materiaal toegevoegd, dat eventueel zou kunnen worden overgedragen.

Omdat de vaccinstammen (schone) deletie mutanten zijn die geattenuëerd en veilig zijn gebleken, is er geen kans dat deze ziekte veroorzaken.

Er is geen kans op nadelige effecten van blootstelling van mens of milieu.

F3 Geef een inschatting van de kans dat de in F.2. beschreven nadelige effecten ook daadwerkelijk optreden

Er zijn geen nadelige effecten beschreven.

Omdat de vaccinstammen deletie mutanten zijn die geattenuerd en veilig zijn gebleken, is er geen kans dat deze ziekte veroorzaakt.

Indien een wildtype bacterie de deletie zou overnemen dan verandert er niets aan het milieu omdat de mutant dan wildtype wordt en de wildtype een mutant, met inperkende eigenschappen als hierboven beschreven.

De stammen zijn al uitgebreid getest in the USA en zijn aangetoond veilig.

F4. Beschrijf de risico's die op kunnen treden ten gevolge van de toepassing van het GGO, waarbij de effecten van eventuele risicobeheersingsmaatregelen zijn meegenomen.

Omdat 1) de vaccinstammen sterk geattenuerd zijn in de gastheer en geen ziekte kunnen veroorzaken en 2) *P. multocida* en *M. haemolytica* moeilijk kunnen overleven buiten de gastheer en 3) het om "schone" deletie mutanten gaat (geen toegevoegd genetisch materiaal), zijn de milieu risico's nihil, en is het niet nodig om verdere risicobeheersingsmaatregelen te nemen voor het uitvoeren van deze vaccinatieproeven.

Samenvattend:

- Er is geen genetisch materiaal toegevoegd
- Er is genetisch materiaal verwijderd om de stammen te attenueren.
- Beide deleties zijn stabiel na passage in runderen
- De vaccinstammen worden niet uitgescheiden na subcutane vaccinatie, wel na intranasale toediening.
- Beide vaccinstammen zijn niet pathogeen (in zowel doel als een van toepassing zijnde range van niet-doelwit dieren).
- Beide stammen zijn gevoelig voor antibiotica
- Beide stammen overleven niet in het milieu buiten de gastheer

Hieruit kan geconcludeerd worden dat er geen kans op nadelige effecten voor mens en milieu is.